

BEST AVAILABLE COPY

FLUORESCENCE DETECTOR WITH TEMPERATURE CONTROLLER

Publication number: JP2003344290

Publication date: 2003-12-03

Inventor: OTSUBO ISAO; KONDO KAZUHIRO; OISHI MICHIO

Applicant: AISIN COSMOS R & D CO LTD; KAZUSA DNA
KENKYUSHO

Classification:

- International: G01N21/01; G01N21/64; G01N21/01; G01N21/64;
(IPC1-7): G01N21/64; G01N21/01

- european:

Application number: JP20020152976 20020527

Priority number(s): JP20020152976 20020527

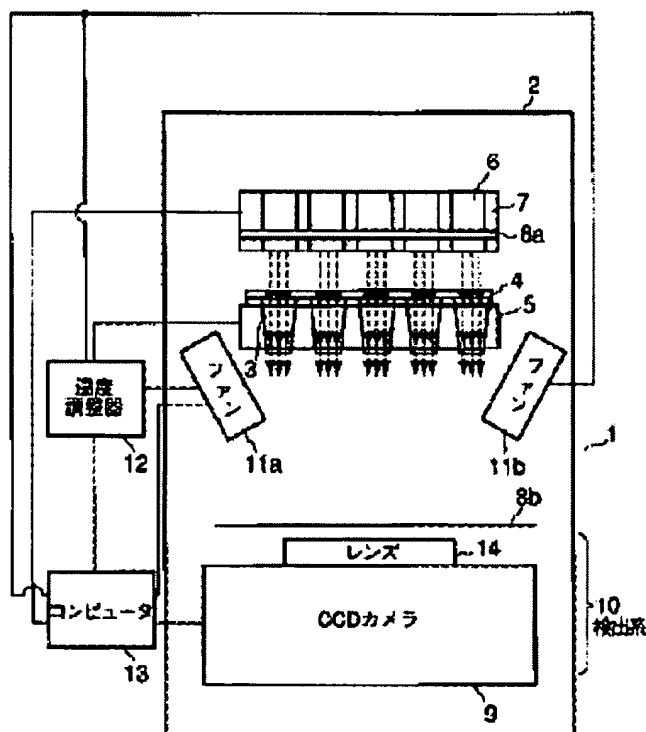
Report a data error here

Abstract of JP2003344290

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a detector capable of simultaneously detecting fluorescent signals generated from a plurality of specimens while simultaneously controlling the temperatures of the specimens with a minimized noise.

SOLUTION: This fluorescence detector comprises a light shielding casing, a support body provided within the casing and having a plurality of holes for holding a container for storing a sample, a light source for emitting light to one opening part of the hole of the support body, a detection system for detecting the fluorescence excited by the light emitted from the light source and generated from the other opening part, and a temperature adjusting system for adjusting the temperature of the casing held by the support body.

COPYRIGHT: (C)2004,JPO



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-344290
(P2003-344290A)

(43) 公開日 平成15年12月3日 (2003.12.3)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テームト* (参考)

G 0 1 N 21/64

C 0 1 N 21/64

Z 2 G 0 4 3

21/01

21/01

F 2 G 0 5 9

C

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2002-152976 (P2002-152976)

(22) 出願日 平成14年5月27日 (2002.5.27)

(出願人による申告) 国などの委託研究の成果に係る特許出願 (平成10年度新エネルギー・産業技術総合開発機構「ゲノムインフォマティクス」委託研究、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの)

(71) 出願人 593043200

株式会社アイシン・コスモス研究所
愛知県刈谷市八軒町5丁目50番地

(71) 出願人 596173810

財団法人かずさディ・エヌ・エー研究所
千葉県木更津市かずさ鎌足2-6-7

(72) 発明者 大坪 功

千葉県木更津市矢那1637番地 株式会社アイシン・コスモス研究所かずさ分室内

(74) 代理人 100058479

弁理士 鈴江 武彦 (外5名)

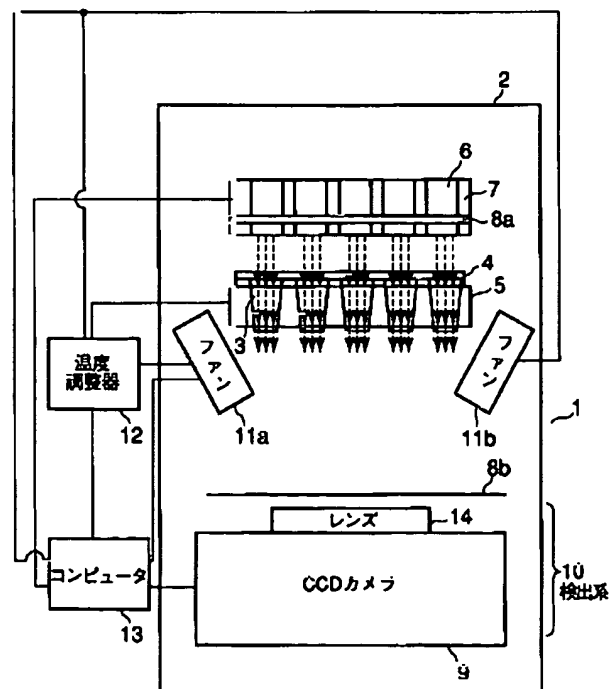
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 温度調節付蛍光検出装置

(57) 【要約】

【課題】 複数の検体の温度を同時に調節しながら、それらから生じる蛍光信号を同時に検出することができ、且つノイズの少ない検出装置を提供する。

【解決手段】 遮光可能な筐体と、前記筐体の内部に具備され、且つ試料を入れるための容器を保持するための孔を複数具備する支持体と、前記支持体の孔の一方の開口部に対して光を照射する光源と、前記光源から照射された光により励起され他方の開口部から生じた蛍光を検出するための検出系と、前記支持体に保持される容器の温度を調節するための温度調節系とを具備することを特徴とする蛍光検出装置。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 遮光可能な筐体と、前記筐体の内部に具備され、且つ試料を入れるための容器を保持するための孔を複数具備する支持体と、前記支持体の孔の一方の開口部に対して光を照射する光源と、前記光源から照射された光により励起され他方の開口部から生じた蛍光を検出するための検出系と、前記支持体に保持される容器の温度を調節するための温度調節系とを具備することを特徴とする蛍光検出装置。

【請求項2】 前記光源と前記支持体との間に、前記光源からの波長を選択するためのフィルタが更に具備されることを特徴とする蛍光検出装置。

【請求項3】 前記検出系が、波長を選択するためのフィルタと、レンズを具備するCCDカメラとを具備することを特徴とする蛍光検出装置。

【請求項4】 請求項1から3の何れか1項に記載の蛍光検出装置において使用される前記容器が光透過性部材からなることを特徴とする蛍光検出装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、試料において進行する反応において生じる蛍光信号をリアルタイムに検出することが可能な装置に関する。

【0002】

【従来の技術】二本鎖DNAに特定の蛍光物質を標識した場合、その二本鎖DNAを加熱することによって蛍光強度の変化が観測できる。そのような蛍光強度の変化は、DNAの長さや配列の種類によって変化率が異なる。この際、二本鎖が完全に熱変性されている場合には蛍光が消えると共に、最大の変化率が観測できる。この時の温度帯を融解温度という。

【0003】従来では、DNAの融解温度を測定する方法としてリアルタイムPCR装置が多く用いられてきた。例えば、バイオラッド社のリアルタイムPCR装置は、バイオラッドのiCycler（登録商標）の上に検出機構を有する装置である。この装置は、サーマルサイクラーで検体を加熱し、それと同時に、側面から反射鏡を介して励起光を検体に照射し、励起され生じた蛍光を反射鏡を介して増幅器で捕らえ、CCDカメラで検出するものである（バイオラッドカタログ第326頁から第327頁を参照されたい）。また、このような検出方式では、検体に対する励起とそれにより得られる蛍光の検出は同方向から行われる。即ち、励起及び検出には、反射鏡等を必要とする反射型光学系が採用されている。このような反射型光学系を用いた場合、検出される蛍光強度が微弱になることが予測され、増幅器が必須である。その結果、検出システムは高価なものになってしまう。

【0004】また、宝酒造のスマートサイクラー（登録商標）システムのような装置も使用されている（宝酒造の個別カタログを参照されたい）。この装置では、検出

の対象となる各検体毎に個別に加熱機構、励起光源及び受光部が配置された特殊なチューブが用いられる。そして、チューブ毎に、その内部の検体がセラミックヒータにより加熱され、同時にチューブ底面に設けられた窓部から励起光が照射される。このような装置では、各検体に対して個別に加熱、励起及び検出手段が具備されているため、システム構成は大型化し、値段も高額化してしまう。また、このような装置は、その構造上、同時に処理できる検体の数が制約される。その上、各検体毎に加熱がなされるので、検体間の温度調節が難しく実際の温度にばらつきが大きい。

【0005】ロッシュ・ダイアグノスティックス社のリアルタイムPCR装置（ライトサイクラー クイックシステム 330）（ロッシュ・ダイアグノスティックス個別カタログを参照されたい）は、キャピラリー状の複数の容器に含まれる全ての検体をファンを用いて一度に加熱又は冷却する装置である。その励起と検出は、反射型光学系を用いた同一の光路を介して行われる。また、複数の容器に対する検出は、単一の受光部が検体間で移動され検出が行われる。このような方法では、多検体を同時に処理する場合であっても、それらの検体について同時に測定を行うことはできず、検体間での検出には時間差が生ずる。また、このような装置では試験に供される検体の数に制約が生じる。単一の受光部及び検体を移動させて検出する方法は、多検体を同時に処理する場合でも、受光部が1つしかないので検体を同時に測定することはできない。従って、複数の検体では測定に時間差が生じてしまう。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】上記の状況に鑑み、本発明の目的は、複数の検体の温度を同時に調節しながら、それらから生じる蛍光信号を同時に検出することができ、且つノイズの少ない検出装置を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するための鋭意研究の結果、本発明者らは以下のような手段を開発した。即ち、遮光用の筐体と、前記筐体の内部に具備され、且つ試料を入れるための容器を保持するための孔を複数具備する支持体と、前記支持体の孔の一方の開口部に対して光を照射する光源と、前記光源から照射された光により励起され他方の開口部から生じた蛍光を検出するための検出系と、前記支持体に保持される容器の温度を調節するための温度調節系とを具備することを特徴とする蛍光検出装置である。

【0008】

【発明の実施の形態】1. 第1の態様

本発明は、透過型光学系を具備する蛍光検出装置である。図1を用いて本発明の第1の態様を説明する。図1には、第1の態様に従う蛍光検出装置1を示す。蛍光検

出装置1は、遮光可能な筐体2と、この筐体2に具備された試料を入れるための容器3を保持するための孔を複数具備する支持体5と、前記支持体の孔の一方の開口部に対して光を照射するための光源6と、前記光源から照射された光により励起され他方の開口部から生じた蛍光を検出するための検出系10を具備する。

【0009】支持体5は、複数の容器3を保持すると共に、容器3の温度の制御を行うことが可能なブロックヒータである。支持体5の温度の制御は、筐体2の外部に配置された温度調節器12により行われ、更に温度調節器の制御は、同様に筐体2の外部に配置されたコンピュータ13によって行われる。また、容器3の温度制御は、容器3の近傍に配置されたファン11a及び／又は11bによって行われてもよい。例えば、ファン11a及び／又は11bは、送風することにより冷却を行っても、熱源を具備して熱風を送ることにより加熱を行ってもよい。

【0010】支持体5に保持される容器3は、上部に開口部を有し、その開口部から流体の出し入れが行われる。また、前記開口部には、測定時には蓋4がセットされる。本発明に従う装置において使用される容器3及び蓋4は光透過性である。

【0011】容器3の上部には、容器3に含まれる試料に対して励起光を照射するための光源6が配置される。光源6は、支持体に具備される複数の容器3の1に対して1つずつ配置される。また、光源6からの光は、所望の励起光を得るために波長選択手段8a、例えば、フィルター等を介して容器3の内部の試料に照射される。

【0012】試料に照射された光は、そこに存在する蛍光物質を励起し、蛍光を発生させる。生じた蛍光は、容器3の下方に配置された検出系10により検出される。本発明に従う蛍光検出装置1は、検出系10として、レンズ14を装備するCCDカメラ9が使用される。このようにCCDカメラにより検出することにより、タイムラグを伴うことなく複数の試料についての検出を達成することが可能である。CCDカメラ9による撮像の制御はコンピュータ13によって行われる。また、検出系10と容器3の間に、波長選択手段8b（例えばフィルター等）を配置し、それにより蛍光波長を選択的に検出してもよい。

【0013】本発明に従って好ましく使用される容器は、光透過性の材質からなることが好ましい。例えば、そのような容器は、ガラス及びプラスチック等から、それ自体公知の方法によって形成することが可能である。容器の容量は所望によって選択することが可能である。容器の底部は、丸底であっても平坦な底であってもよい。また、容器の壁面は傾斜を有していてもよい。しかしながら、支持体5に配置された孔の壁面に密着することが可能であるように、当該孔の形状と容器3の形状が選択されることが必要である。例えば、容器壁面に傾斜

がある場合には、当該孔もテーパとして構成される。しかしながら、このような容器壁面の傾斜やテーパは必ずしも必要ではない。ここで使用される蓋は、容器と同様の材質であってもよく、異なる材質であってもよいが、光透過性である。

【0014】また、支持体5に配置される容器3の個数は、所望に応じて変更することが可能である。図1では5つの容器が記載されているが、これは例示のために示したものであり、2以上であればよい。特に、従来の24ウェル、96ウェル及び384ウェル等のマイクロプレートのウェルの個数及び間隔等を考慮した配置で当該孔を配置することが好ましい。また、使用される容器は、所望の個数が開口部周囲で繋がっていてもよく、1つ1つが独立していてもよい。

【0015】本発明に従って好ましく使用される光源6は、所望に応じて励起光を照射することが可能な光源であれば、どのような光源を使用してもよい。例えば、発光ダイオード（即ち、LED）、キセノンランプ、ハロゲンランプ及びレーザー等を使用してよく、発光ダイオード（即ち、LED）が好ましい。

【0016】本発明に従って好ましく使用されるレンズ14及びCCDカメラ9は、撮像するために一般的に使用される何れのレンズ及びCCDカメラであってもよい。

【0017】本発明に従って好ましく使用される温度調節器は、コンピュータの指示に従って温度を調節することが可能な手段であればよい。

【0018】本発明に従って好ましく使用されるコンピュータは、キーボード及びマウス等の入力手段、CPU等の演算手段、モニター及びプリンター等の出力手段、並びに処理プロセス等のプログラム、テーブル及びデータ等を記憶及び／又は記録するためのメモリ等を具備するそれ自体公知の一般的に使用されるコンピュータであればよい。

【0019】また、光源6の照射開始及び終了のタイミング等は、予め実施者によりコンピュータ13に入力された条件に従って、コンピュータ13によって管理される。また、検出系10の動きも、予め実施者によってコンピュータ13に設定された条件に従って、コンピュータによって管理される。

【0020】図1の例では、2つのファンを使用した例を示したが、ファンを使用せずに支持体5の温度調節機能のみによって温度調節を達成してもよく、1以上のファンを所望の位置に配置してもよい。

【0021】また、図1の例では、温度調節器12及びコンピュータ13を筐体2の外部に配置させたが、これに限定されるものではなく、何れかを筐体2の内部に配置しても、両者を筐体2の内部に配置しても、コンピュータ13を構成する一部の手段を筐体2の内部に配置してもよい。

【0022】このような図1に示す態様は、試料に含有される蛍光物質からの蛍光信号を検出する際に、単色の励起光で検出する機構である。

【0023】2. 支持体

本発明に従う支持体の例を図2に示す。図2(A)に示すように、支持体20は、基板21とそこに多数配置された孔22とコードヒータ24を配置するための溝23を具備する。孔22は、等間隔を空けて整列して配置される。溝23は、コードヒータ24による熱を均等に孔22に具備される容器に対して与えるように配置される。図2に示す例では、孔22によりなる行間を蛇行するように設計されている。しかしながら、このようなパターン以外であっても、本発明に従って好ましく使用される。

【0024】また、図2(B)に示すように各孔22は、テーパを形成するように傾斜した壁面からなっている。

【0025】本発明に従う支持体は、上述したとおり、容器を保持する役割と容器の温度を調節する機能を有する。温度を調節する機能は、支持体自体の熱伝導性により、それ自体ブロックヒータとして機能すればよい。本発明に従って好ましく使用される支持体は、例えば、銅及びアルミニウム等の熱伝導性のある材質によって、それ自身公知の方法により構成されればよい。

【0026】図2では、孔の数が72である例を示したが、孔の数はこれに限定されるものではなく、2以上であればよい。特に、従来の24ウェル、96ウェル及び384ウェル等のマイクロプレートのウェルの個数及び間隔等を考慮した配置で当該孔を配置することが好ましい。

【0027】ここでは、コードヒータを使用する例を示したが、コードヒータ以外の加熱体を基板21に組み込んでもよい。加熱体は、外部から加えられたエネルギーを熱として基板21に伝えることが可能な材質により構成されればよい。そのような加熱体を配置する場合、本態様と同様に溝を利用して配置されてもよく、また、基板21の内部に層として形成されてもよい。

【0028】[例]

例1：蛍光検出装置1

図1に示した装置を用いて蛍光検出を行う手順を以下に説明する。

【0029】図1に示すように、底面が透明な複数の容器3に蛍光標識した検体を入れ、検体加熱時の蒸発を防止するための透明又は半透明のキャップ4で検体を密閉する。これを、検体を密閉した容器3及びキャップ4を容器3の側面に接する形状に加工され、且つ検体容器3の底面が検出できるような穴加工を施された加熱ブロック5に装着する。加熱ブロック5には、ヒータ線及び温度センサーが埋め込まれている。これにより加熱ブロック5によって容器3が加熱される。一方、冷却は、加熱

ブロック5両側に配置された冷却用ファン11a及び/又はbによる送風により行われる。これらによって、当該容器内の温度は所望の温度に調節され、反応が行われる。

【0030】ここで、加熱ブロック5及び冷却用ファン11は、温度調節器12に接続され、これにより制御されている。更に、温度調節器12は、コンピュータ13に接続されている。コンピュータ13に予め設定されている温度になるようにコンピュータ13によって制御され、これによって加熱ブロック5の温度が制御される。

【0031】各検体容器3の上部には励起光用の小型の光源6が配置される。光源6は、波長選択用のフィルター8aを装着したハウジング7に固定され、キャップ4に密接するように設置される。光源6からの励起光はハウジング7のフィルター8a及びキャップ4を通して検体に照射され、容器3の底面から蛍光が生じる。実施者は、予めコンピュータ13に温度設定及び検出間隔の条件設定を行っており、この設定に従って加熱ブロック5の温度制御がコンピュータ13によって行われる。設定された条件に従って検出が行われる。検出時には、検体から生じた蛍光は、交換機構を有する検体用フィルター8bを通り、それにより励起光成分が除去され、更にレンズ14を装着したCCDカメラ9に画像として取り込まれる。取り込まれた画像はコンピュータ13に転送される。コンピュータでは、1画像に含まれる容器3の底面に相当する部分のみの輝度が検出されるべき蛍光強度として測定される。各条件で測定された輝度は、コンピュータ13に蓄積され、全測定が終了した後に解析がなされる。この解析は、実施者が手動で行ってもよく、予め入力されたプログラム等の情報に従ってコンピュータによって行われてもよい。

【0032】例2：蛍光検出装置2

本発明に従う検出装置の更なる例を図3に示す。この例は、検体の蛍光を検出する際に、複数波長を励起光として使用する場合に有効な構成である。

【0033】光源34から照射された光は、検体を含む容器31が配置されるのとは反対側に配置された凹状に湾曲した反射鏡44によって反射され集光された後にフィルター35を通る。フィルター35を通った光は、更にコリメータレンズ42を通り、夫々の容器31の底部と直行するように照射される。このようにフィルター35において、一端集光されるようにすれば、図1に示すような構成の装置に比べてフィルター35は小さいもので十分である。このような構成により、複数の波長を選択するための複数のフィルター35を併置し、それらを任意に選択するような構成を容易に達成できる。

【0034】図3に示すように、底面が透明な複数の容器31に蛍光標識した検体を入れ、検体加熱時の蒸発を防止する透明又は半透明のキャップ32で検体を密閉する。容器31の側面に接する形状に加工され、且つ検体

容器31の底面が検出できるような穴加工を施した加熱ブロック33に対して、検体を密閉した容器31及びキャップ32を装着する。図示はしないが、加熱ブロック33には、ヒータ線及び温度センサーが埋め込まれている。これにより加熱が行われる。また、容器31の冷却は、加熱ブロック33の両側に配置された冷却用ファン39によって行われる。加熱ブロック33は、温度調節器40及び／又はコンピュータ41に接続されている。これにより所望の温度になるようにその動きが管理される。

【0035】実施者は、予めコンピュータ41に対して所望の温度等の条件を入力しておき、この入力された情報に従って加熱ブロック33及び／又は冷却用ファンは、コンピュータ41により制御される。

【0036】複数の容器31の上部中心には励起光用の光源34が配置される。光源34からの励起光は、交換機構を持つ波長選択用のフィルター35を通り、コリメータレンズ42群により平行光に偏光される。その後、キャップ32を通り、検体に照射される。その結果、容器31の底面から蛍光が生ずる。

【0037】実施者は、予めコンピュータ41に、入力することにより温度設定、波長条件及び／又は検出間隔等の条件設定を行う。この設定に従って、加熱ブロック33の温度制御が行われる。設定された条件に従って検体から生じた蛍光は、交換機構を有する検出用フィルター36を通り、それにより励起光成分が除去された後に、レンズ37を装着したCCDカメラ38に画像として取り込まれる。

【0038】複数波長を選択する場合には、波長選択用フィルター35及び検出用フィルター36を切替交換し、所望の波長で撮像し、各画像を取り込む。取り込まれた画像は、コンピュータ41に転送され、画像内の容器31の底面部分のみの輝度が測定される。各条件で測定した輝度は、コンピュータ41に蓄積され、測定終了時に解析される。

【0039】図3に示す例は、上述のような光源系43、即ち、光源34、反射鏡44、フィルター35、コリメータレンズ42を具備する以外は、図1に示した例と同様であってよい。従って、光源系43以外は、上述の第1の態様に記載した通りに各部分を変更してもよい。また、本例で使用される光源は、例えば、発光ダイオード（即ち、LED）、キセノンランプ及びハロゲンランプ等を使用してよく、キセノンランプ及びハロゲンランプ等が好ましい。

【0040】例3：蛍光検出装置の筐体内の構成例
図4に更なる例を示す。図4に示す例は筐体内の構成の1例である。

【0041】遮光用筐体の内部には、サンプルチューブ52の側面形状に密着する用に形成された孔を有するヒートブロック53が、架台64に固定されている。蛍光

検出を行う際には、サンプルチューブ52には、その開口部を密閉するためのキャップ54がその開口部にはめ込まれる。

【0042】サンプルチューブ52の上部には励起用LED光源アレイユニット56が配置される。励起用LED光源アレイユニット56は、LED光源57とレンズユニット58と励起フィルター59を具備する。励起用LED光源アレイユニット56は、キャップ54に保持するキャップホルダー55に固定され、それにより安定にサンプルチューブ52に対する照射が行われる。

【0043】ここで使用されるサンプルチューブ52は、上述の容器に相当し、上述の容器と同様の材質で製造され、光透過性である。キャップ54も光透過性であり、上述の蓋に相当する。レンズユニット58は、一般的に使用されるレンズを含む。これは、LED光源57から照射された光をサンプルチューブに含まれる検体に対して適切に照射するための手段である。また、サンプルチューブ52の夫々に対して1対1でレンズとLED光源57が配置される。

【0044】励起用LED光源アレイユニット56とキャップホルダー55との固定は、ボルト又はピンで行われる。

【0045】ヒートブロック53の下方には、検出系60が配置される。検出系60には、CCTVレンズ61を装備した冷却CCD62が高さの調節が可能な高さ調整治具63に支えられ配置される。

【0046】例4

図5は、例3に示した蛍光検出装置のサンプルチューブ52周辺の拡大図である。サンプルチューブ52は、支持体であるヒートブロック53の孔の壁面に密接するように配置される。ヒートブロック53は、サンプルを加熱するためのコードヒータ70を具備する。

【0047】サンプルチューブ52の開口部には、そこに含まれるサンプルの蒸発を防止するための蒸発防止キャップ54がセットされる。サンプルチューブ52の上方には、LED励起光源71が配置される。LED励起光源71から照射された励起光は、レンズによって適切な範囲に集光又は散光されて、目的の範囲に照射される。また、励起光は励起フィルター72を通過ことによって、所望の波長のみが限定され照射される。選択された波長を有する励起光はキャップホルダー55内部を通過して、外部に漏れることなく効率的にサンプルに対して照射される。この照射により、サンプルより生じた蛍光は、その下方に配置されるCCDカメラ（ここには図示されていない）により撮像され、画像解析される。

【0048】

【実施例】上述の例3及び例4の構成を有し、且つ第1の態様の構成を有する蛍光検出装置を用いて蛍光検出試験を行った。

【0049】1. テスト用検体

蛍光検出試験に用いた核酸は以下の通りである。即ち、配列番号1から3の合成オリゴヌクレオチド（以下、夫々オリゴ1～オリゴ3と記す）を3種類使用した。オリゴ1に対してオリゴ2は、1ポイントの変異差（A→G）があり、理論上の融解温度は、オリゴ1が69.65℃であり、オリゴ2が67.98℃である。各オリゴ1、2をオリゴ3の下線部に変成して二本鎖構造を形成した。

【0050】続いて、2種類の検体を調合する。調合方法は下記の通りである。濃度100μMの合成オリゴヌクレオチド2種類ずつ（即ち、オリゴ1と2、オリゴ1と3）を各1μLずつ取り、25μLの500nMトリス塩酸、10mMエチレンジアミン四酢酸（EDTA）pH7.5緩衝液、及び水を加えて1900μLとした。これを100℃で5分間加熱して室温まで冷却した。次に核酸染色試薬GelStar0.2μLに19

オリゴヌクレオチド

1.pUC	TGCTACAGGCATCGTGGTGTCA	理論上の融解温度 69.65℃
2.pBR	TGCTGCAGGCATCGTGGTGTCA	67.98℃
3.pUCcEND	GAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCGATGCCTGTAGCA	

2. 蛍光検出試験

上記1において調製した2種類の検体を別々のサンプルチューブに100μLずつ分注した。蒸発防止用キャップで密閉し、加熱ブロックに装着した。蒸発防止用キャップは、更に筒状の突起のついた断熱板で上部を覆った。このような構成によって熱成分が、光源部に行くことを最小限に抑えた。この断熱板の上部に、予め励起波長選択用フィルターを装着した励起用LED光源アレイユニットを装着した。加熱ブロックには、コードヒータ、温度センサーが埋め込まれており、これは更に温度調節器に接続され、加熱温度制御される。また、温度調節器はコンピュータに接続され、コンピュータに記録された画像処理ソフトにより測定温度及び測定温度間隔等の設定がなされている。

【0053】画像処理ソフトを含むコンピュータは、検出用のCCDカメラと接続されている。コンピュータは、そこに設定された測定温度間隔に従ってCCDカメラを制御して撮像を行い、その画像を取り込ませる。また、CCDカメラにはレンズ及び励起光成分を除去するための光学フィルターが装着されている。

【0054】LED励起光源を点灯させ、励起用フィルターを通して検体に照射すると、検体から二本鎖構造の消失に比例した蛍光信号が生ずる。検体の加熱は、画像処理ソフトにより設定した所望の温度範囲及び測定温度間隔に従って行われ、且つ撮像もその設定に従って行われる。

【0055】本実験では、予想される融解温度が70℃付近のため、測定温度範囲を50～75℃とし、その温度範囲内を1℃間隔とした。このような条件下で蛍光強度の変化をCCDカメラで撮像し、得られた画像を検出

0μLの500nMのトリス塩酸、10mMのエチレンジアミン四酢酸（EDTA）pH7.5緩衝液と水を加えて1900μLとして、先程の加熱済のサンプル100μLを加えて変異検出サンプルとした。最終的な構成は50nMのDNA、GelStarの1/1000希釈液、50mMのトリス塩酸、1mMのエチレンジアミン四酢酸（EDTA）pH7.5である。

【0051】二本鎖の消失を検出し、それによって融解温度（即ち、T_m値）を得る場合には、二本鎖核酸を認識する蛍光物質、即ち、インタカレータを使用すればよい。ここで使用した蛍光物質はゲルスター（登録商標、BMA社製）である。本発明に従って使用される蛍光物質は、これに限定されるものではなく、例えば、エチジウムブロマイド、ゲルスター及びサイバークリーン1（登録商標、MolecularProbes社製）が使用される。

【0052】

理論上の融解温度

69.65℃

67.98℃

し、検体部分の画像処理を行って蛍光強度を測定した。

【0056】その結果を、図6と図7に示した。図6は、上記の2種類の検体についての蛍光強度の変化を示すグラフである。横軸は温度であり、縦軸は蛍光強度である。図7は、図6のグラフの値を夫々に微分して得たT_m値を示すグラフである。そこにおいて示された2つのピークが、各検体の融解温度である。これらの夫々のT_m値は、理論上の融解温度とほぼ一致していた。従って、本発明の装置によりT_m値を得ることができた。

【0057】また、2つの検体の融解温度の差から1塩基についての変異を検出することが可能である。従って、本発明の装置により遺伝子の変異解析を行うことが可能であることが証明された。

【0058】本発明は、透明な検体容器を使用し、底面に測定用穴を設けた加熱ブロックに容器を設置、検体を加熱し、上部又は下部から励起光を照射し、励起光と対象系に配置したCCD受光部により、複数の検体の蛍光成分を同時に画像検出し、画像の検体部分の蛍光強度を測定する装置である。

【0059】本発明は、透過型光学系を採用しているため、反射鏡等の光学系が除去できると共に、反射型のように励起と検出方法が同一でなく、検出時に励起光成分が容易に除去できる。従って、蛍光成分を効率よく検出でき、増幅器を必要としないため、安価なシステム構成が構築できる。

【0060】更に、単一の加熱ブロックで検体を加熱するため、温度調整が容易で、検体間の温度のばらつきを最小限に抑えることができる。

【0061】更に、検出は、CCD受光部で画像としても同時検出するため、検体間の検出時の時間差が発生し

ない。また、一度に処理できる検体数も、容器や加熱ブロックの大きさに応じて検出画像の画角を換えることで対応できるので、容易に増やすことができる。

【0062】また、本発明に従う蛍光検出装置により、PCRやハイブリダイゼーション等、試料中において進行する反応中に生じる蛍光信号の変化を、リアルタイムで検出できるリアルモニタリングシステムが提供された。

【0063】また、本発明に従う蛍光検出装置は、一塩基置換（即ち、SNP）及びマイクロサテライト多型などの多型や、その他、核酸についての変異解析を行うことが可能である。

【0064】

【発明の効果】本発明により、複数の検体の温度を同時に調節しながら、それらから生じる蛍光信号を同時に検出することができ、且つノイズの少ない検出装置が提供された。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に従う蛍光検出装置の第1の態様を示す図。

【図2】本発明に従う支持体の1例を示す図。

【図3】本発明に従う蛍光検出装置の構成例を示す図。

【図4】本発明に従う蛍光検出装置の構成例を示す図。

【図5】本発明に従う蛍光検出装置の構成例を示す図。

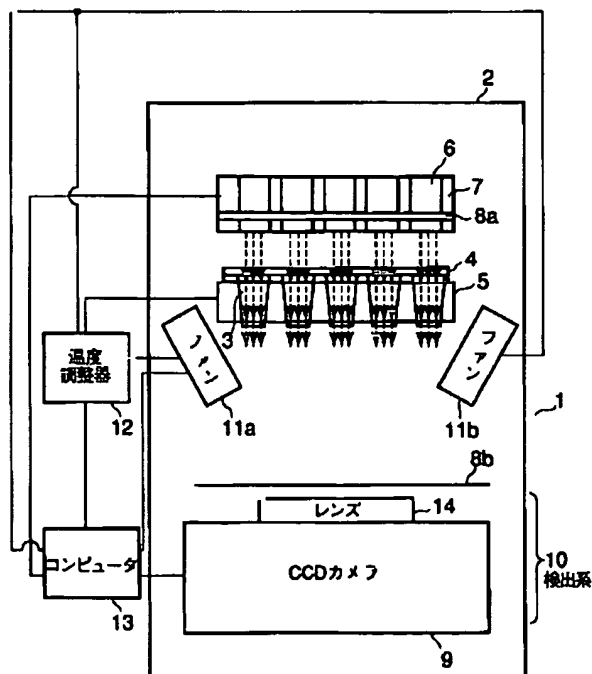
【図6】本発明の従う蛍光検出装置により測定した蛍光強度の変化を示すグラフ。

【図7】本発明の従う蛍光検出装置により測定した融解温度を示すグラフ。

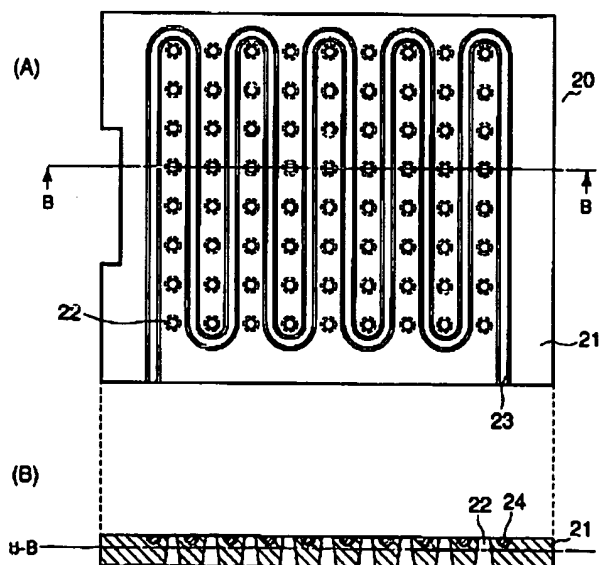
【符号の説明】

1. 蛍光検出装置 2. 筐体 3. 容器 4. 蓋（又はキャップ） 5. 支持体 6. 光源 7. 光源系 8. 波長選択手段 9. CCDカメラ 10. 検出系 11. ファン 12. 温度調節器 13. コンピュータ 14. レンズ 20. 支持体 21. 基板 23. 溝 24. コードヒータ 31. 容器 32. キャップ 33. 加熱ブロック 34. 光源 35. フィルター 36. 検出用フィルター 37. レンズ 38. CCDカメラ 39. ファン 40. 温度調節器 41. コンピュータ 42. コリメータレンズ 43. 光学系 44. 反射鏡 51. 遮光用筐体 52. サンプルチューブ 53. キャップホルダー 54. キャップ 55. キャップホルダー 56. 励起用LED光源アレイユニット 57. LED光源 58. レンズユニット 59. 励起フィルター 60. 検出系 61. CCTVレンズ 62. 冷却CCD 63. 高さ調整治具 64. 架台 70. コードヒータ 71. LED励起光源 72. 励起フィルター 73. 断熱板

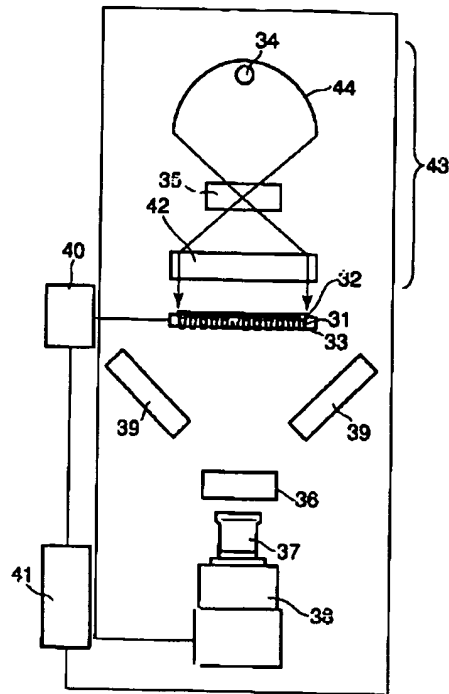
【図1】



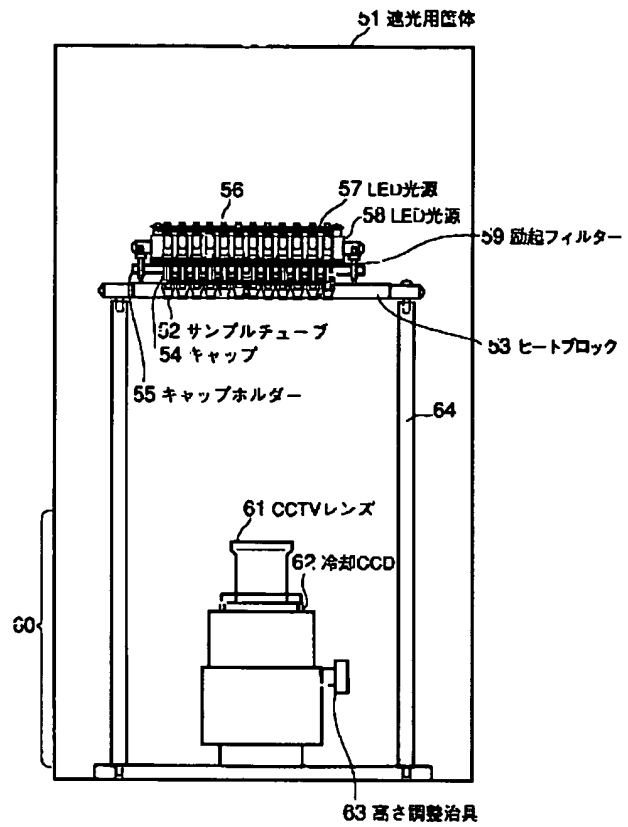
【図2】



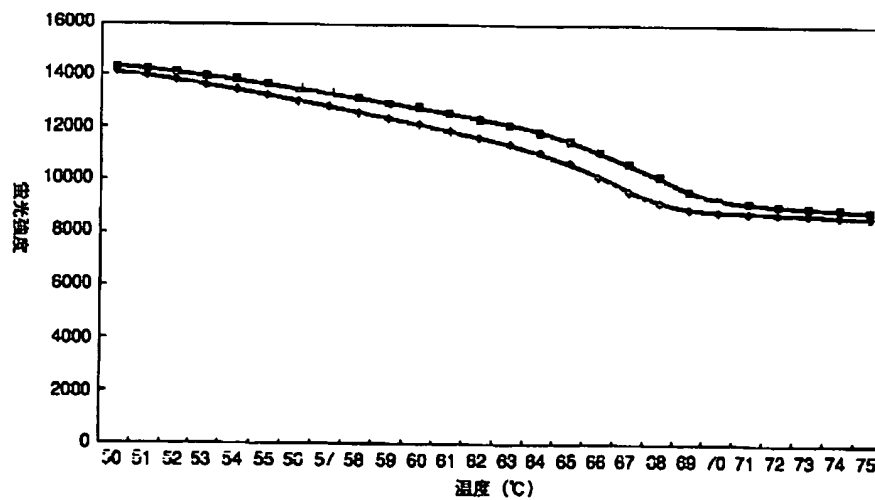
【図3】



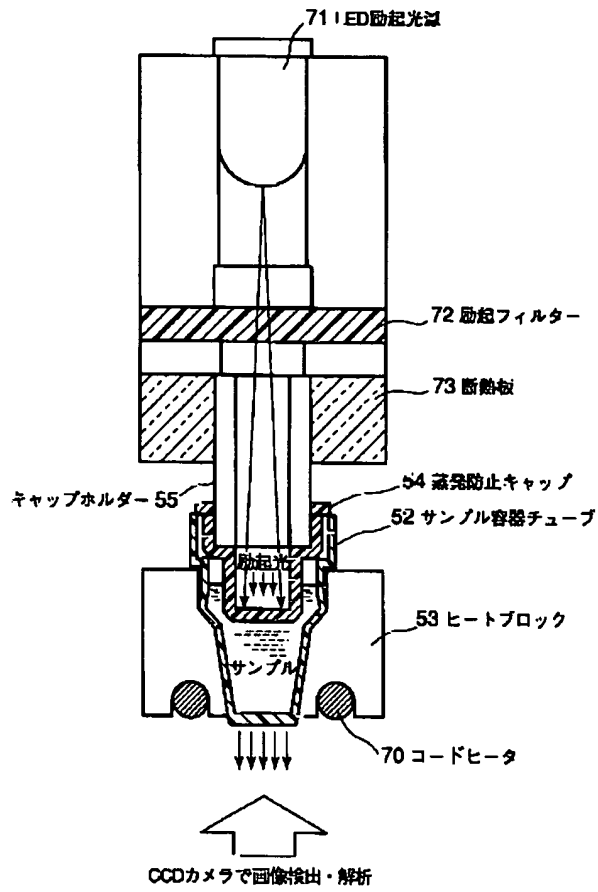
【図4】



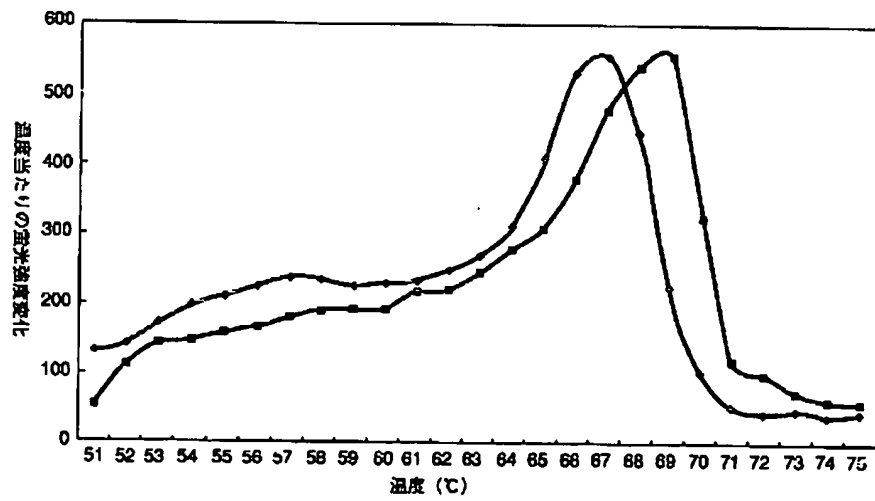
【図6】



【図5】



【図7】



フロントページの続き

(72)発明者 近藤 和博
千葉県木更津市矢那1637番地 株式会社ア
イシン・コスモス研究所かずさ分室内

(72)発明者 大石 道夫
千葉県木更津市矢那1532番3号 財団法人
かずさディー・エヌ・エー研究所内

Fターム(参考) 2G043 AA01 BA16 CA03 DA02 DA08
EA01 FA01 GA07 GB07 HA01
HA03 JA02 KA09 LA03 MA03
2G059 AA03 BB12 CC16 DD03 DD16
EE07 EE11 FF01 FF11 GG01
GG02 GG03 JJ02 JJ11 KK04
MM10

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record.

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☒ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.